

# Relación entre el gen *Rps 1k* y la resistencia a *Pythium ultimum* y *P. irregulare* en soja

Pablo Enrique Grijalba<sup>1</sup>; Azucena del Carmen Ridao<sup>2</sup>; Mónica Steciow<sup>3</sup>, Maria Virginia López<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Agronomía, UBA; <sup>2</sup>Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP, <sup>3</sup>Instituto Spegazzini, UNLP.

Autor para correspondencia: Pablo Enrique Grijalba (grijalba@agro.uba.ar)

Data de chegada: xx/xx/xxx. Aceito para publicação em: xx/xx/xxxx.

10.1590/0100-5405/2130

## RESUMEN

Grijalba, P.E.; Ridao, A. C.; Steciow, M.; López, M.V.. Relación entre el gen *Rps 1k* y la resistencia a *Pythium ultimum* y *P. irregulare* en soja *Summa Phytopathologica*, v.43, n.2, p.XX-XX, 2017.

En el cultivo de soja *Pythium* spp. produce la pudrición de semillas y raíces, y “*damping off*”. El objetivo del presente trabajo fue verificar la relación entre el gen *Rps 1k* de resistencia a *Phytophthora sojae* y *P. ultimum* y *P. irregulare*. Cuatro genotipos de soja, dos con el gen *Rps 1k* (SE+1 y SE+2) y dos sin el gen (SE-1 y SE-2) se sembraron en suelo inoculado y sin inocular. Los genotipos SE-1 y SE-2 no difirieron entre sí, ya sea que estuviesen inoculados o no, ni tampoco difirieron del SE+2. En cambio, los genotipos

con el gen *Rps1k* difirieron entre sí, tanto los que estuvieron inoculados como los no inoculados. SE+2 presentó un 95% de emergencia mientras que SE+1 presentó un 78.35% de emergencia pero en ambos casos la emergencia disminuyó cuando se inoculó, con 63.35% y 34.15% respectivamente. Bajo las condiciones del presente ensayo las variedades utilizadas conteniendo el gen *Rps 1k* a *Ph. sojae* no presentaron mayor número de plántulas emergidas frente a las cepas probadas de *P. ultimum* ni de *P. irregulare*.

**Palabras claves:** *Oomycetes*; *Damping off*; *Glycine max*; *Phytophthora sojae*

## ABSTRACT

Grijalba, P.E.; Ridao, A. C.; Steciow, M.; López, M.V.. Relationship between *Rps 1k* gene and resistance to *Pythium ultimum* and *P. irregulare* in soybean. *Summa Phytopathologica*, v.43, n.2, p.XX-XX, 2017.

In soybean *Pythium* spp. produces seed and root rot and “*damping off*”. The aim of this study was to verify the relationship between resistant gene *Rps 1k* to *Phytophthora sojae* with *Pythium ultimum* and *P. irregulare*. Four genotypes of soybean were sown on inoculated soil, two of them with gene *Rps 1k* and the other two without it. Genotypes without the gene did not differ among themselves, no matter whether they were inoculated or not. On the other

hand, *Rps1k* genotypes differed from each other, whether or not they were inoculated. SE+2 presented 95% of emergence whereas SE+1 presented 78.35% of emergence, but in both cases the emergence decreased when genotypes were inoculated with 63.35% and 34.15% respectively. Under the assayed conditions the gene *Rps1k* resistant to *Ph. sojae* did not show a greater number of emerged seedlings against the tested strains of *P. ultimum* or *P. irregulare*.

**Keywords:** *Oomycetes*; *Damping off*; *Glycine max* ; *Phytophthora sojae*

## RESUMO

Grijalba, P.; Ridao, A. C.; Steciow, M.; López, M.V.. Relação entre gene e resistência *Rps 1k* com resistência a *Pythium ultimum* e *P. irregulare* em soja. *Summa Phytopathologica*, v.43, n.2, p.XX-XX, 2017.

Em soja *Pythium* spp. causa apodrecimento de sementes, da raiz e “*tombamento*”. O objetivo deste estudo foi verificar a relação do gene de resistência *Rps 1k* de *Phytophthora sojae* com *Pythium ultimum* e *P. irregulare*. Quatro genótipos de soja foram semeados em solo inoculado ou não com *Pythium* spp, dois deles com o gene *Rps 1k* (SE+1 e SE+2) e os outros dois sem ele (SE-1 e SE-2). Os genótipos SE-1 e SE-2 não diferiram entre si, não importa se eles foram inoculados ou não, nem eram diferentes de SE + 2. Por

outro lado, genótipos com *Rps 1k* diferiam uns dos outros, sendo inoculados ou não. SE + 2 apresenta uma emergência de 95% enquanto que a SE + 1 tinha 78.35% de emergência, mas em ambos os casos a emergência diminuiu quando foram inoculados, com 63.35% e 34.15% respectivamente. Nas condições analisadas o gene *Rps 1k* de resistência a *Ph. sojae* não mostrou aumento do número de plântulas emergidas testados contra as espécies de *P. ultimum* ou *P. irregulare*.

**Palavras-chave:** *Oomycete*; *Damping off*; *Glycine max*; *Phytophthora sojae*

Mundialmente se considera que las enfermedades de la soja [*Glycine max* (L.) Merr.] son las responsables del 10% al 15% de las pérdidas ocasionadas en la producción de esta oleaginosa (32). Las principales enfermedades de la raíz y de la base del tallo son producidas por un complejo de microorganismos del suelo. Dentro de este complejo se encuentran distintas especies de *Pythium* que causan la pudrición de semillas y de raíces, y el “*damping off*” de pre y post-

emergencia. El desarrollo de estas enfermedades se ve favorecido por un deficiente drenaje y la consecuente baja aireación del suelo, que permite la dispersión de las zoosporas (15).

Hasta el presente se han identificado 160 especies de *Pythium* (3) al menos 17 de estas especies son patógenas de soja (25). En Argentina las especies determinadas asociadas a plántulas de soja son: *P. irregulare* Buisman, *P. ultimum* Trow, *P. sylvaticum* Campbell & Hendrix, *P.*

*inflatum* Matthews, *P. debaryanum* Hesse, *P. rostratum* Butler, *P. catenulatum* Matthews y *Phytophthora helicoides* Drechsler (14, 21).

Generalmente el control de la enfermedad se efectúa con el tratamiento de curasemillas específicos para oomycetes. Según Grijalba y Ridao (13) el control químico de la podredumbre por *Pythium* en plántulas de soja fue eficaz con la aplicación del fungicida metalaxil, de manera preventiva, con respecto a otros fungicidas probados. Sin embargo, se han reportado cepas resistentes a metalaxil en varios países (22, 26, 30, 31) por lo que es necesario implementar otras técnicas de manejo para esta enfermedad, tanto químicas como biológicas, que provean un control adecuado.

Rosso et al. (2) encontraron que cultivares de soja con el gen de resistencia a *Phytophthora sojae* Kaufmann & Gerdemann *Rps 1k* tenían significativamente menor decoloración de raíces e incidencia de *Pythium* en parcelas de campo que aquéllos que no tenían el gen. Posteriormente se determinó que el gen de resistencia a *P. aphanidermatum* Edson Fitzp. denominado *RPA1* estaba cerca pero no contenía al gen *Rps 1k* (23) y posiblemente podría conferir resistencia a diferentes especies de *Pythium* patógenas de soja (25).

El objetivo del presente trabajo fue verificar la relación del gen *Rps 1k* con las especies de *Pythium* prevalentes en la provincia de Buenos Aires.

## MATERIALES Y METODOS

### Obtención de los aislados.

Los aislados fueron colectados a partir de campos de las localidades de Pergamino y Balcarce (provincia de Buenos Aires, Argentina) durante los años 2009 a 2011. Se utilizó la técnica de trampa con plántulas de soja, aislando *Pythium* spp. a partir de suelo plantado principalmente con soja durante varios años. Raíces con necrosis o con podredumbre se lavaron para remover partículas de suelo y se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio (al 1,5% de Cl activo) durante 30 segundos. Luego se lavaron con agua destilada estéril y se secaron con servilletas de papel, sembrándolas en medio PARP-APG (17). Se empleó la técnica de la burbuja o del agar invertido para evitar el desarrollo de bacterias (27). Después de 24- 48 h los aislados se transfirieron a nuevas placas de Petri con APG. Los aislados de *Pythium* spp. se identificaron mediante técnicas morfológicas. En caso de dudas se utilizaron técnicas moleculares (no descriptas en este trabajo) para su confirmación. Así mismo se evaluó su patogenicidad tanto *in-vitro* como *in-vivo* con ensayos de plántulas.

### Selección de aislados para ensayos:

Para inducir la formación de estructuras reproductivas de los aislados obtenidos, se colocaron 3 o 4 secciones de agar con micelio de aprox. 0.5 cm de diámetro y 7 días de crecimiento. Luego fueron colocados en cajas de Petri conteniendo agua destilada estéril con el agregado de 15 a 20 trocitos de hojas de *Agrostis* sp. de 0.5 a 1 cm de longitud previamente hervidos durante 10-15 minutos. Posteriormente, a la 48-72 h, los segmentos de césped colonizado se observaron en microscopio óptico (2). La identificación y caracterización se efectuó teniendo en cuenta la morfología de las colonias en APG y V8, las estructuras vegetativas y reproductivas sexuales y asexuales (6, 10, 11, 29).

### Ensayo de patogenicidad:

Se probó la patogenicidad de los aislados tanto *in vitro* como

*in vivo* según la metodología de Dorrance et al. (8). A) *in vitro*: Se sembró cada uno de los aislados en el centro de cajas de Petri de 9 cm de diámetro. Cuando las colonias estuvieron por completar las cajas (2-3 días aproximadamente) se colocaron en cada una 10 semillas de soja previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio (al 1,5% de Cl activo) durante 30 segundos. A siete días de la siembra se contaron las semillas y/o plántulas muertas. B) *in vivo*: En macetas plásticas de 12 cm de diámetro se colocó sustrato comercial (previamente tinalizado dos veces con vapor de agua durante una hora y regado hasta saturación) hasta su mitad. Se colocó el contenido de una caja de petri de 9 cm de cada aislado desarrollado en APD durante 4 días a 22 °C, se tapó con un cm de espesor de sustrato tinalizado, sobre el que se sembraron 20 semillas de soja que fueron tapadas también con un centímetro de espesor de sustrato tinalizado. Las macetas inoculadas se mantuvieron durante 15 días a 20-22 °C hasta que se efectuó el recuento de plántulas emergidas.

### Genotipos/Semilla con y sin gen *Rps 1k*

Un semillero local proveyó cuatro genotipos de soja de similar pedigree, dos con el gen *Rps 1k*, de resistencia a *Ph. sojae* (identificados como SE+1y SE+2), y dos sin el gen (identificados como SE-1 y SE-2). Para corroborar la presencia o no del gen estudiado, los genotipos se inocularon mediante la técnica del hipocótilo con los aislados de *Ph. sojae* F13-1 (Fórmula de virulencia *Rps* 1a-1c-1k-3a-7) y F13-3 (Fórmula de virulencia *Rps* 1c-3a-7) obtenidos durante 2013 a partir de plantas con síntomas de la localidad de Fontezuela (provincia de Buenos Aires), los mismos se chequearon con un set de ocho genotipos diferenciales. Se sembraron 10 a 12 semillas de cada genotipo por maceta de 10 cm de diámetro. Se utilizó sustrato comercial. La inoculación se realizó en estado vegetativo VC (9). Se usaron cultivos de 10 a 12 días crecidos en medio AV8 semi-sólido (1.2% de agar). La inoculación se efectuó por el método de herida al hipocótilo sobre la que se colocó 0.1 ml de inóculo. Posteriormente, las plantas se mantuvieron a 100% de humedad relativa durante 24 horas a 20-25°C. Los genotipos se consideraron susceptibles cuando a los cinco días posteriores a la inoculación se produjo la muerte del 70% o más de las plantas, y resistentes. En el mismo momento de observación se detectó el 70% o más de plantas vivas, la reacción se consideró intermedia entre ambos valores. Cada genotipo se repitió dos veces y en los casos de dudas se inoculó una maceta más.

### Inoculación de suelo:

La inoculación se efectuó mediante la infestación de suelo con cinco aislados de *P. ultimum* y cinco de *P. irregulare* (todos de patogenicidad probada) obtenidos a partir de cultivos comerciales de los partidos de Pergamino y Balcarce durante los años 2009 a 2011.

El micelio de los aislados (aprox. 40 g de agar colonizado) se colocó en suelo previamente tinalizado y colocado en bandejas plásticas (10 x 20 x 5 cm) en las que se sembraron 20 semillas de cada variedad. Los tratamientos fueron asignados a las unidades experimentales (bandejas) de acuerdo a un diseño completamente aleatorizado con 6 repeticiones por tratamiento. Se evaluó el porcentaje de emergencia a los 21 días desde la siembra. Los resultados obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza para un modelo con dos factores y posterior prueba de comparaciones múltiples DGC (7). En todos los casos se empleó un nivel de significancia del 5%. Se verificaron los supuestos del modelo mediante pruebas de Shapiro Wilks y Levene. Se empleó InfoStat (16) como *software*. El ensayo se repitió dos veces.

**Tabla 1.** Emergencia de plántulas a los 21 días desde la siembra de genotipos sin inoculo e inoculados con *Pythium* spp.

Genotipos	Inoculado	Emergencia		% de Emergencia
SE+2	No Inoc	19.00	A	95.00%
SE-1	No Inoc	18.00	A	90.00%
SE-2	No Inoc	18.00	A	90.00%
SE+1	No Inoc	15.67	B	78.35%
SE-1	Inoc	15.33	B	76.65%
SE-2	Inoc	15.00	B	75.00%
SE+2	Inoc	12.67	C	63.35%
SE+1	Inoc	6.83	D	34.15%

Emergencia: Número promedio de plántulas emergidas (de un total de 20 semillas sembradas).

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ )

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Obtención y selección de aislados para ensayos:

De los 114 aislados obtenidos se seleccionaron 10 de las especies de mayor prevalencia, cinco aislados de *P. irregulare* y cinco de *P. ultimum*, que además presentaron una patogenicidad del 100% in vitro y de 80% o más in vivo. Entre los aislados obtenidos ninguno perteneció a la especie *P. aphanidermatum*. En el género *Pythium* existen especies muy patógenas como *P. aphanidermatum* o *P. graminicola* (2, 18). En Argentina *P. aphanidermatum* fue determinado en cultivos intensivos en invernáculos de Garín y La Plata (Provincia de Buenos Aires) (12, 19) aunque hasta el momento no ha sido reportado en el cultivo de soja. Los ensayos para la determinación del gen de resistencia *RP1* (23) se efectuaron con *P. aphanidermatum* que infecta a temperaturas de 30 °C o mayores (28). Mientras que *P. irregulare* y *P. ultimum* atacan a la soja a temperaturas de 20 °C o menos (20). Además la técnica utilizada para la determinación del gen *RP1* fue la inoculación del hipocótilo (27), la que deja de lado resistencias de campo o generales (1), entre ellas la resistencia a la penetración por parte de las zoosporas y/o del micelio infectivo.

### Genotipos/Semilla con y sin gen *Rps 1k*

Cinco días después de la inoculación, los genotipos SE+1y SE+2 presentaron reacción de compatibilidad tanto con el aislado F13-1 como con el aislado F13-3. Por su parte los genotipos SE-1y SE-2 presentaron reacción de compatibilidad con el aislado F13-1, pero no así con el F13-3.

Se ha observado cierta diferencia varietal en soja con suelos inundados (25) lo que puede tener una relación directa ya que *Pythium* es un oomycete que requiere agua para el ataque de las zoosporas. Entre las variedades sobresalió el cultivar Archer que se liberó al mercado en 1990 con resistencia a *Ph. sojae* *Rps 6* y *Rps 1k* (5), especulándose que la resistencia a *Pythium* se debía al gen de resistencia *Rps 1k* (25). Pero en el presente ensayo no se detectaron diferencias significativas entre las medias de los genotipos sin el gen, ya sea que estuviesen inoculados o no, ni tampoco difirieron del SE+2. En cambio, los genotipos con el gen *Rps 1k* difirieron entre sí, tanto los que estuvieron inoculados como los no inoculados. SE+2 presentó 19 plántulas promedio emergidas (95% de emergencia) mientras que SE+1 presentó 15.67 plántulas promedio emergidas (76.35% de emergencia) pero en ambos casos la emergencia disminuyó cuando se inoculó, con 12.67 y 6.83 plántulas promedio emergidas (63.35% y 34.15% de emergencia) respectivamente. Existen citas de resistencia genética a *Pythium* en este sentido, la resistencia a *P. inflatum* en maíz esta controlada por un gen dominante (*Rpi1*), la resistencia a *P. ultimum* en poroto esta controlada por un gen dominante,

mientras que la resistencia a *P. ultimum* var. *ultimum* en poroto también esta controlada por un gen dominante (25). Es necesario continuar con estos ensayos para encontrar genes de resistencia específicos o poder implementar otras técnicas de manejo para esta enfermedad.

Se concluye que con las condiciones del presente ensayo las variedades utilizadas que contienen el gen *Rps 1k* a *Ph. sojae* no presentaron mayor número de plántulas emergidas frente a las cepas probadas de *P. ultimum* ni de *P. irregulare*.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al semillero Don Mario por la provisión de los genotipos de soja y a la alumna Carolina Cardoso de Jesús por su apoyo como tesista de grado.

## BIBLIOGRAFIA

- Agrios, G.N. **Plant Pathology**. 5th ed. Academic Press, San Diego, 2005, 922p.
- Abad, Z.G.; Shew, H.D.; Lucas, L.T. Characterization and pathogenicity of *Pythium* Species isolated from Turfgrass with Symptoms of Root and Crown Rot in North Carolina. **Phytopathology**, St. Paul, v.84, p.913-921, 1994.
- Abad, Z.G. Symposium on Oomycete Pathosystems. **Challenges in Understanding and Managing Oomycetes**. Penn State University, Pennsylvania, 2010.
- Abad, Z.G.; Shew, H.D.; Lucas, L.T. Characterization and pathogenicity of *Pythium* species isolated from turfgrass with symptoms of root and crown rot in North Carolina. **Phytopathology**, St. Paul, v.84, p.913-921, 1994.
- Cianzio, S.R.; Shultz, S.P.; Fehr, W.R.; Tachibana, H. Registration of 'Archer'. Soybean. **Crop. Sci.**, Madison, v.31, p.1707, 1991.
- Dick, M.W. Systematics of the Peronosporomycetes including accounts of the marine straminipilous protists, the plasmodiophorids and similar organisms. **Straminipilous Fungi**. Alphen aan den Rijn. Kluwer Academic Publishers, 2001, 670 p.
- Di Rienzo, J.A.; Guzmán, A.W.; Casanoves, F.A. Multiple Comparison Method based on the Distribution of the Root Node Distance of a Binary Tree obtained by Average Linkage of the Matrix of Euclidean Distances between Treatment Means. **Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics**, Washington, v.7, n.2, p.1-14, 2002.
- Dorrance, A.E.; Berry, S.A.; Bowen, P.; Lipps, P.E. Characterization of *Pythium* spp. from three Ohio fields for pathogenicity on corn and Soybean and metalaxyl sensitivity. En: <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2004/pythium/> Consulta: 8 Oct. 2011.
- Fehr, W.E.; Caviness, C.E.; Burmood, D.T.; Pennington, J. State of development descriptions for soybean, Glycine max (L.). Merr. **Crop Science**, Madison, v.11, p.929-931, 1971.
- Frezzi, M.J. Especies de *Pythium* fitopatógenas identificadas en la República Argentina. **Revista de Investigaciones Agrícolas**, Buenos Aires, v.10, n.2,

- p.113-241, 1956.
11. Frezzi, M.J. Especies del género *Pythium* y *Phytophthora* fitopatógenas identificadas en Argentina. **Boletín. Eds., Serie Didáctica 2. Inst. de Cs Agronómicas**. Córdoba, 1977, 96 p.
  12. Grijalba, P.E.; Zapata, R.L.; Palmucci, H.E.; Baron C. Podredumbre basal de plantas adultas de tomate causada por *Pythium aphanidermatum* (Oomycota) **Bol. Soc. Argent. Bot.**, Buenos Aires, v.50, n.1, p.11-15, 2015.
  13. Grijalba, P.E.; Ridao, A. del C. Control Químico de *Pythium* spp. Asociados con plántulas de soja. En prensa **Revista de Investigaciones Agrícolas**, Buenos Aires, Abril 2017. On line.
  14. Grijalba, P.E.; Palmucci, H.E.; Mohs, A.; Pase, S. Identificación de especies de *Pythium* asociadas con plántulas de soja. **2do. Congreso Argentino de Fitopatología**. Mar del Plata, 2011, p.115.
  15. Hartman, G.L.; Sinclair, J.B. Rupe, J.C. (EDS.). **4th. Ed. Compendium Soybean Diseases**. APS Press. Inc., St. Paul, MN., 1999, 100 p.
  16. Infostat. **Software estadístico** Universidad Nacional de Córdoba (FCA -UNC). Disponible en: [www.infostat.com.ar](http://www.infostat.com.ar). Consultado: Junio, 2010.
  17. Jeffers, S.N.; Martin, S.B. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. **Plant Diseases**, St. Paul, v.70, p.1038-1043, 1986.
  18. Jiangab, Y.N.; Haudenshieldc J.S.; Hartman G. L. Characterization of *Pythium* spp. from soil samples in Illinois. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.34, n.3, p.448-454, 2012.
  19. Palmucci, H.E.; Grijalba, P.E. Root and Stem Rot Caused by *Pythium aphanidermatum* on Poinsettia in soilless culture system in Buenos Aires Province, Argentina. **Australasian Plant Disease Notes**, Quintland, v.2, n.1, p.139-140, 2007.
  20. Lumsden, R.D.; Ayers, W.A. Influence of soil environment on the germinability of constitutively dormant oospores of *Pythium ultimum*. **Phytopathology**, St. Paul, v.65, p.1101-1107, 1975.
  21. Pastor, S.; Ferri, M.; Scandiani, M.M. Identificación de especies de *Pythium* spp. aisladas con trampas de plántulas de soja. **2do Congreso Argentino de Fitopatología** Mar del Plata, 2011, 130 p.
  22. Porter, L.D.; Hamm, P.B.; David, N.L.; Gieck, S.L.; Miller, J.S.; Gundersen, B.; Inglis, D.A. Metalaxyl-M-Resistant *Pythium* species in potato production areas of the Pacific Northwest of the U.S.A. **American Journal of Potato Research**, Maine, v.86, p.315-326, 2009.
  23. Rosso, M.L.; Rupe, J.C.; Chen, P.; Mozzoni, L.A. Inheritance and genetic mapping of resistance to *Pythium* damping-off caused by *Pythium aphanidermatum* in 'Archer' soybean. **Crop Science**, Madison., v.48, p.2215-2222, 2008.
  24. Rosso, M.L.; Rupe, J.C.; Rothrock, C. Resistance of soybean cultivars to *Pythium* damping-off and root rot based on *Rps1k* gene. **Phytopathology**, St. Paul, v.95, pS90, 2005.
  25. Rupe, J.C.; Rothrock, C.S.; Bates, G.; Rosso, M.L.; Avanzato, M.V.; Chen, P. (2011). Resistance to *Pythium* Seedling Disease in Soybean, Soybean - **Molecular Aspects of Breeding**, Dr. Aleksandra Sudaric (Ed.), ISBN: 978-953-307-240-1, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/soybeanmolecular-aspects-of-breeding/resistance-to-pythium-seedling-disease-in-soybean>
  26. Sanders, P.L. Failure of metalaxyl to control *Pythium* blight on Kentucky golf courses. **Phytopathology**, St. Paul, v.77, p.121, 1987.
  27. Schmitthenner, A.F.; Hobe, M.; Bhat, R.G. *Phytophthora sojae* races in Ohio over a 10-year interval. **Plant Dis.**, St. Paul, v.78, p.269-276, 1994.
  28. Thomson, T.B.; Athow, K.L.; Laviolette, F.A. The effect of temperature on the pathogenicity of *Pythium aphanidermatum*, *P. dearyanum* and *P. ultimum* on soybean. **Phytopathology**, St. Paul, v.61, p933-935, 1971.
  29. Van Der Plaats-Niterink, A.J. Monograph of the genus *Pythium*. **Studies in Mycology** No.21. Baarn, Centraalbureau Voor Schimmelcultures.1981, 242 p.
  30. Van Jaarsveld, E.; Wingfield, M.J.; Drenth, A. Effect of metalaxyl resistance and cultivar resistance on control of *Phytophthora nicotianae* in tobacco. **Plant Dis.**, St. Paul, v.86, p.362-366, 2002.
  31. Weiland, J.E.; Santamaria, L.; Grünwald, N.J. Sensitivity of *Pythium irregulare*, *P. sylvaticum*, and *P. ultimum* from forest nurseries to mefenoxam and fosetyl-Al, and control of *Pythium* damping-off. **Plant Dis.**, St. Paul, v.98, p.937-942, 2014.
  32. Wrather, J.A.; Anderson, T.R.; Arsyad, D.M.; Tan, Y.; Ploper, L.D.; Portae-Puglia, A.; Ram, H.H.; Yorinori, J.T. Soybean disease loss estimates for the top ten soybean- producing countries in 1998. **Can. J. Plant Path.**, Ottawa, v.23, p.115-121, 2001.